

棉铃虫嗅觉受体基因的克隆及组织特异性表达

王桂荣 吴孔明 苏宏华 郭予元*

(中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 昆虫嗅觉受体是一个高度变异的蛋白家族,但是其中一类嗅觉受体很特殊,它们在不同昆虫体内高度保守。该文作者从棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 体内克隆得到了这类受体基因,命名为 *ORHarm*。*ORHarm* 编码 473 个氨基酸残基,序列中有 7 个跨膜区,是典型的 G 蛋白偶联的受体。*ORHarm* 与已经报道的昆虫同类嗅觉受体的同源性在 60% 以上,与近缘种烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 嗅觉受体的同源性高达 99.4%。半定量 RT-PCR 研究表明,*ORHarm* 主要在棉铃虫成虫触角中表达,在喙中也有表达,但表达量较低,在成虫其他的部位不表达,在棉铃虫发育的各个时期,如卵、幼虫、蛹和成虫体内,也都有表达。*ORHarm* 不仅在感受挥发性气味物质的过程中起着重要的作用,而且也参与液态化学刺激的识别过程。

关键词: 棉铃虫; 嗅觉受体蛋白; 基因克隆; 表达谱; 半定量 RT-PCR

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)06-0823-06

Gene cloning and tissue-specific expression of an olfactory receptor in *Helicoverpa armigera*

WANG Gui-Rong, WU Kong-Ming, SU Hong-Hua, GUO Yu-Yuan* (State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: Olfactory receptors in insects were found to be extremely diverse, but there is one exception. There is a kind of olfactory receptor, which shares a rather high identity among different insects. The gene encoding the similar olfactory receptor from *Helicoverpa armigera* was cloned and named as *ORHarm*. The *ORHarm* encoded 473 amino acid residues, including seven putative transmembrane domains, which is the typical characteristic of G protein-coupled receptors. *ORHarm* shares very obvious homology (> 60%) with similar olfactory receptors reported from other insects and the homology with the close sibling species *Heliothis virescens* reaches 99.4%. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that *ORHarm* was highly expressed in antenna of *H. armigera* moth, low expressed in proboscis and not expressed in other tissues of the moth. *ORHarm* was also expressed in different developmental stages of egg, larva, pupa and imago. *ORHarm* may play important roles in sensing volatile odors as well as sensing liquid chemical stimulates.

Key words: *Helicoverpa armigera*; olfactory receptor protein; gene cloning; expression pattern; semi-quantitative RT-PCR

昆虫的嗅觉系统在昆虫生存和适应环境过程中起着重要的作用,昆虫的嗅觉识别过程是非常复杂的,多种蛋白参与了这一过程,这些蛋白主要包括气味结合蛋白(Vogt and Riddiford, 1981; 王桂荣等, 2002b; Wang *et al.*, 2004a)、嗅觉受体(Clyne *et al.*, 1999; Vosshall *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 2002)以及气味降解酶(Rogers *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004b)。昆虫气味结合蛋白是一类分子量小、高度水溶性的酸性蛋白,气味结合蛋白识别和结合外界

气味分子是昆虫感受外界气味分子的第一步生化反应(Li and Prestwich, 1997; 王桂荣等, 2002a)。

除了气味结合蛋白的初步过滤和识别外,昆虫对成千上万种结构各异的气味分子的识别主要依赖于嗅觉受体介导的气味分子与嗅觉神经的专一性结合(Clyne *et al.*, 1999; Vosshall *et al.*, 1999; Zwiebel and Takken, 2004)。因此,深入研究嗅觉受体的结构与功能对于阐明嗅觉识别的分子机理非常重要。最初在老鼠嗅觉上皮细胞中发现了一类 G 蛋白偶

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30330410)

作者简介: 王桂荣,男,1972年生,安徽宿松人,博士,主要从事昆虫生物化学和分子生物学研究, E-mail: wgrsun@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 010-62894786; E-mail: yuyuanguo@hotmail.com

收稿日期 Received: 2005-03-18; 接受日期 Accepted: 2005-06-28

联的受体家族,它们参与气味信号的识别,随后在鸟、鱼、青蛙、人体和线虫中也发现了这类受体家族基因(Buck and Axel, 1991; Ngai *et al.*, 1993; Raming *et al.*, 1993; Ben-Arie *et al.*, 1994)。在过去的十多年中,很多实验室尝试了多种搜索同源基因的方法克隆昆虫嗅觉受体基因,如比较已经发现的受体基因同源性设计简并引物进行 RT-PCR 扩增,或利用哺乳动物的嗅觉受体基因筛选昆虫 cDNA 文库,但是均以失败而告终。近几年,在果蝇 *Drosophila melanogaster* 基因组全序列测定的基础上,两个研究组破译了编码果蝇嗅觉受体蛋白的基因家族,有趣的是这些受体基因形成了一个高度变异的家族,即所发现的各种嗅觉受体基因之间同源性很低,而且与线虫和脊椎动物或其他 G 蛋白偶联受体家族根本没有同源性(Clyne *et al.*, 1999; Vosshall *et al.*, 1999)。这很好地解释了早期应用同源搜寻的方法在昆虫中寻找与脊椎动物嗅觉受体相似的基因没有取得成功的原因。

最近,随着冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 全基因组序列测定的完成,在这两种昆虫中也找到了很多的编码嗅觉受体的基因,这些基因同源性都很低(Hill *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 2002, 2004),但是另有一类嗅觉受体基因比较特别,来自于不同昆虫甚至哺乳动物体内的这类基因同源性都很高,根据基因的结构和表达谱推测这类受体可能与其他专一性受体结合,参与大部分甚至所有气味分子的识别(Krieger *et al.*, 2003; Pitts *et al.*, 2004)。如果能够调控这类基因,将来就有可能发展害虫防治的新方法和新途径。本文作者从我国重要农业害虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 触角中克隆得到了这类基因,并对其在棉铃虫不同组织和发育阶段的表达进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

棉铃虫为本实验室用人工饲料饲养,根据本研究需要取不同发育时期和不同组织部位的材料后,立即放在液氮中冷冻,然后置 -70°C 保存备用。T-easy 载体和反转录试剂盒购自 Promega 公司,限制性内切酶、Ex Taq DNA 聚合酶和 3'-RACE 试剂盒购自 TaKaRa 公司,5'-RACE 试剂盒购自 GIBCO BRL 公司。

1.2 棉铃虫不同组织总 RNA 的分离及 cDNA 合成

根据 Wang 等(2003)的方法,用 Trizol 试剂提取棉铃虫不同组织总 RNA(Life Techniques 公司产品)。取 $2\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 为模板, OligdT₁₅₋₁₈ 为引物进行反转录获得第 1 链 cDNA,以此作为 PCR 模板。

1.3 引物设计和合成

用 DNASIS 软件比较已报道的昆虫嗅觉受体基因的 cDNA 序列,根据保守区结合 PCR 引物设计原则设计了 2 对简并引物(ORs1 和 ORr1, ORs2 和 ORr2)进行 PCR 扩增,根据 PCR 测序结果设计了 5'-RACE(5OR1、5OR2 和 5ORrt)和 3'-RACE(3OR1 和 3OR2)反应引物。再根据序列拼接结果设计了 2 对特异性引物,1 对引物(OR600 和 OR1142)用于半定量 RT-PCR 反应,另 1 对引物(OR136 和 OR1560)用于扩增棉铃虫嗅觉受体基因全长阅读框,为了便于将该基因亚克隆到表达载体上,在引物上分别引入了 BamH I 和 Sal I 酶切位点。引物在北京博亚生物技术有限公司合成,引物序列如下:

ORs1 : 5'-(C/T)T(C/T/A)AT(T/C)GA(A/G)GAGAG(C/T)TCATC-3';

ORr1 : 5'-G(T/C)TG(C/T/G)A(C/T)CAA(C/T)ACCATGAAG-3';

ORs2 : 5'-G(A/G/C)T(T/A)T(A/T/C)G(G/C/T)AT(C/A)AA(G/A)TA(C/T)TGGG-3';

ORr2 : 5'-TCCAT(C/T/A)AC(T/G/C)GATGA(G/A)CTCTC-3';

ORs3 : 5'-GA(G/A/C)GTCAA(C/T)GA(G/A/T)CT(C/A/G)AC(A/G/C)GC-3';

ORr3 : 5'-ACGACATGCTTATGCCTCTC-3';

5OR1 : 5'-GCAGCCTCCTCATCTTGCTG-3';

5OR2 : 5'-AGAGGACAGTCATCCCGCAG-3';

5ORrt : 5'-ACTCGCCGAAGAAG-3';

3OR1 : 5'-GCAGTGTGAGAAGGCTATG-3';

3OR2 : 5'-CACTTGATTTGTTTCGCTTCG-3';

OR600 : 5'-CTTCTTCGGCGAGTCACTG-3';

OR1142 : 5'-ACGACATGCTTATGCCTCTC-3';

OR136 : 5'-CTCGGATCCATGATGACCAAGGTGAAGGC-3'(下划线表示 BamH I 酶切位点);

OR1560 : 5'-ACTGTCTGACTTACTTGAGCTGTATCAATACCATG-3'(下划线表示 Sal I 酶切位点)。

1.4 PCR 扩增和 RACE 反应

以合成的 cDNA 为模板,加入 $10\times$ Ex Taq 缓冲液 $5\text{ }\mu\text{L}$ (含 Mg^{2+}),正向和反向引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$ (10 mol/L) 2.5 mmol/L dNTP $4\text{ }\mu\text{L}$, Ex Taq DNA 聚合酶 $0.25\text{ }\mu\text{L}$ ($5\text{ U}/\mu\text{L}$),加水至 $50\text{ }\mu\text{L}$,混匀,离心。放入 PCR 仪

扩增。反应条件为：94℃变性 3 min，接着进行 32 个循环，循环条件为 94℃ 1 min，45~55℃ 1 min，72℃ 1~3 min，然后 72℃保温 10 min。

RACE 反应参照 Wang 等(2004a)方法。RACE 反应条件为：94℃变性 3 min，94℃ 30 s，52℃ 30 s，72℃ 30 s，72℃保温 10 min。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检查，回收目的片段。

1.5 PCR 和 RACE 产物的克隆、鉴定及序列测定

RACE 产物经电泳回收纯化后，连接到 T-easy 载体上(按 Kit 说明进行)，然后转化大肠杆菌 DH5α，挑取白色菌落，培养后提取少量质粒[质粒提取参照 Sambrook 等(1989)方法]，用 *Eco*R I 酶切鉴定重组阳性克隆。挑选含有目的片段的阳性克隆，放入含有 Amp 100 μg/μL 的 LB 培养液振荡过夜，碱法提取质粒，采用 ABI377 全自动测序仪测序。

1.6 半定量 RT-PCR

半定量 RT-PCR 参考王桂荣等(2004)方法，以 1 μL cDNA 为模板，加入 10× *Ex* Taq 缓冲液 5 μL(含 Mg^{2+})，正向和反向引物各 1 μL(10 mol/L)，内标基因 18S RNA 的扩增引物各 1 μL(18SS：5'-ttagtgggtcttcggaccg-3' 和 18SR：5'-cttcgcgaggttcccctacg-3')，2.5 mmol/L dNTP 4 μL，*Ex* Taq DNA 聚合酶 0.25 μL(5 U/μL)，加水至 50 μL。反应条件为：94℃ 3 min；94℃ 30 s，55℃ 1 min，72℃ 3 min，26 个循环，72℃ 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 序列测定

以棉铃虫触角 RNA 为模板，用 2 对简并引物进

行 PCR 扩增，电泳后回收 200~300 bp 的条带，与 T-easy 载体连接，转化大肠杆菌 DH5α，根据蓝白斑筛选阳性重组子，用 *Eco*R I 酶切进行鉴定，确定重组子中含有目的片段，然后进行测序，测序结果在 NCBI 上利用 BLAST 进行同源搜寻，结果表明有 2 个 250 bp 左右的片段与昆虫的嗅觉受体基因高度同源。根据测定的序列设计了特异性引物分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE 反应，结果分别得到了 560 bp 和 350 bp 的特异性条带，同样将这些片段连到 T-easy 载体上进行测序。

拼接 PCR、3'-RACE 和 5'-RACE 测序结果，得到了一个编码棉铃虫的嗅觉受体的 cDNA 序列，命名为 *ORHarm*，该序列蛋白编码区长 1 422 bp，5'非翻译区长 134 bp，3'非翻译区不完整，但是得到了终止密码子 TAA，因此蛋白编码区是完整的。由该序列推定的蛋白序列由 473 个氨基酸残基组成。跨膜结构分析结果表明，推导的氨基酸序列具有 7 个 α 螺旋跨膜区，是一个典型的 G 蛋白偶联受体 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) (图 1)。由 *ORHarm* 基因推导的氨基酸序列与已经报道的其他昆虫的嗅觉受体同源性在 60% 以上，与近缘种烟芽夜蛾嗅觉受体的同源性高达 99.4%，特别是在羧基端几乎完全一致(图 2)，可见该受体在昆虫进化过程中高度保守，也说明了该蛋白对于昆虫的正常生存起着至关重要的作用。

为了证明以上 PCR、3'-RACE 和 5'-RACE 片段是来源于同一个基因，我们设计了 1 对特异性引物(*OR136* 和 *OR1560*)，PCR 扩增得到了一条 1 425 bp 的特异性条带，测序结果与拼接序列一致。目前，已经将棉铃虫 *ORHarm* 基因的阅读框亚克隆到了表达

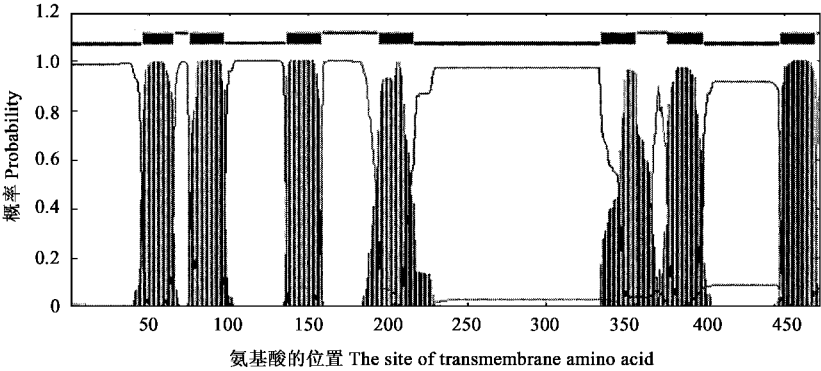


图 1 棉铃虫 *ORHarm* 跨膜区预测

Fig. 1 Predicted transmembrane domains of *ORHarm* from *Helicoverpa armigera*

跨膜区 1 Transmembrane domain 1 (46-65)；跨膜区 2 Transmembrane domain 2 (75-97)；跨膜区 3 Transmembrane domain 3 (136-158)；跨膜区 4 Transmembrane domain 4 (194-216)；跨膜区 5 Transmembrane domain 5 (334-356)；跨膜区 6 Transmembrane domain 6 (376-398)；跨膜区 7 Transmembrane domain 7 (447-469)，括号中数字表示组成跨膜区的氨基酸的位置 The numbers in bracket show the site of transmembrane amino acid.

ORHarm	MMTKVKAQ...GLVSDCLMPNLIKLMQMGHFLFNYHSENAGMSNLLRKITYASTHAILIFTIHYA	59
ORHvir	MMTKVKAQ...GLVSDCLMPNLIKLMQMGHFLFNYHSENAGMSNLLRKITYASTHAILIFTIHYA	59
ORBmor	MMTKVKQTQ...GLVTDCLMPNIRLLQAAGHFLFNYHADTSGMMLRKITYSSAHAVLIVVHYI	59
ORAgam	MQV..QPTKYVGLVADCLMPNIRLMQASGHFLFRYVTGPILI....RKVYSSWVTLAMVLIQFF	56
ORDro	MTTSMQPSKYTGLVADCLMPNIRAMKYSCLFMHNETGGSAFM....RKVYSSVHLVFLMQFT	58
ORHarm	CMGINVAKYSDEVNELTANTITVLFPAHTIIKLAFPAENSKSFYRTLAVWNCNSHPLFTES	121
ORHvir	CMGINVAKYSDEVNELTANTITVLFPAHTIIKLAFPAENSKSFYRTLAVWNCNSHPLFTES	121
ORBmor	CMGINVAQYKDEVNELTANTITVLFPAHSIIKLAFPAENSKSFYRTLAVWNCNSHPLFTES	121
ORAgam	AILGNLATNADDEVNELTANTITITLFFTHSVTKFIYFAMNSENFYRTLAIWNQNTNTHPLFAES	118
ORDro	FILVNVALNAEDEVNELSGNTITITLFFTHCITKFIYLAVNQKNFYRTININWQVNTNTHPLFAES	120
ORHarm	DARYHCIALTKMRRLYFICGTVLSVISWVITLFFGCSVRMVTNKETNETLTEVVPRPLPK	183
ORHvir	DARYHCIALTKMRRLYFICGTVLSVISWVITLFFGCSVRMITNKETNETLTEVVPRPLPK	183
ORBmor	DARYHCISLSKMRRLYFICGTVFSVISWVITLFFGCSVRMIASKEKNETLTEVPAPRLPLK	183
ORAgam	DARYHSLALAKMRKLLVLVMAITVLSVAVVITLFFGCSVKTVLDKATNETYTVDIPRLPIK	180
ORDro	DARYHSLALAKMRKLEFLVMLTIVASATAWITLFFGCSVKMVVDHETNSSTPVEIPRLPIK	182
ORHarm	AWYFPNAMSGTYIVAFQVYVWLLFSMAIANLMDVFCSWLIFACEQLQHLKAITKELMEL	245
ORHvir	AWYFPNAMSGTYIVAFQVYVWLLFSMAIANLMDVFCSWLIFACEQLQHLKAITKELMEL	245
ORBmor	AWYFPKTMSCGGYVVFQIYCIYELLFSMALANLLDVIFCSWLIFACEQLQHLKAITKELMEL	245
ORAgam	SWYFPNAMSGPAYIFSIYCIYELLFSMVQSNLADVFCSWLILACEQLQHLKGIMRSLMEL	242
ORDro	SFYFPNASHGMEFYMISAFQIYVVLFSMIHSLNLDVFCSWLIFACEQLQHLKGIMKELMEL	244
ORHarm	SASLDTYRPNTAELFRASSTEKS.....EKIPDVTVDMDIRGIYSTQDDFGMTLRGAGGRL	300
ORHvir	SASLDTYRPNTAELFRASSTEK.....EKIPDVTVDMDIRGIYSTQDDFGMTLRGAGGRL	299
ORBmor	SAAALDTYRPNTAELFRVSSDCKT.....EKVDAVDMDIRGIYSTQDDFGMTLRGAGGKL	300
ORAgam	SASLDTYRPNSQLFRASAGSKSELIINEEKDPDKDFDLSGIYSSKADWCAQFRAPSTLQ	304
ORDro	SASLDTYRPNSAALFRSLSANSKSELIHNEEKDPGTMDM..SGIYSSKADWCAQFRAPSTLQ	305
ORHarm	QNFGQQNP.N.....PNGLTKQEMLSAIAIKYWVERHKHVRLVASIGDITYGTALLFHM	354
ORHvir	QNFGQQNP.N.....PNGLTKQEMLSAIAIKYWVERHKHVRLVASIGDITYGTALLFHM	353
ORBmor	QNFAEN.N.....PNGLTAKQEMLSAIAIKYWVERHKHVRLVASIGDITYGTALLFHM	353
ORAgam	TFDENGNGN.....PNGLTKQEMMVSRAIAIKYWVERHKHVRLVASIGDITYGPALLFHM	359
ORDro	SFGNGGGGNGLVNGANPNGLTKQEMMVSRAIAIKYWVERHKHVRLVAAIGDITYGPALLFHM	367
ORHarm	IVSTIKLTLLAYQATKINGINVYAFSTIGYLSYTLGQVFFFCIFGNRLIEESSSVMEAAAYSC	416
ORHvir	IVSTIKLTLLAYQATKINGINVYAFSTIGYLSYTLGQVFFFCIFGNRLIEESSSVMEAAAYSC	415
ORBmor	IVSTIKLTLLAYQATKINGINVYAFSTIGYLVYTLGQVFFFCIFGNRLIEESSSVMEAAAYSC	415
ORAgam	LTSTIKLTLLAYQATKIDGVNVYGLTVIGYLCYALAQVFFFCIFGNRLIEESSSVMEAAAYSC	421
ORDro	LTSTIKLTLLAYQATKINGVNVYAFVTVGYLCYALAQVFFFCIFGNRLIEESSSVMEAAAYSC	429
ORHarm	QWYDGSEEAFTVQIVCQQCQKAMTISGAKFFTVSLDLFASVLGAVVTFYFMVLIQLK	473
ORHvir	QWYDGSEEAFTVQIVCQQCQKAMTISGAKFFTVSLDLFASVLGAVVTFYFMVLIQLK	472
ORBmor	QWYDGSEEAFTVQIVCQQCQKAMTISGAKFFTVSLDLFASVLGAVVTFYFMVLIQLK	472
ORAgam	HWYDGSEEAFTVQIVCQQCQKAMTISGAKFFTVSLDLFASVLGAVVTFYFMVLIQLK	478
ORDro	HWYDGSEEAFTVQIVCQQCQKAMTISGAKFFTVSLDLFASVLGAVVTFYFMVLIQLK	486

图 2 棉铃虫嗅觉受体蛋白 ORHarm 与其他昆虫嗅觉受体蛋白氨基酸序列比较

Fig. 2 Alignment of amino acid residues of olfactory receptor between *Helicoverpa armigera* and other insects
ORHarm : 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* ; ORHvir : 烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (Krieger *et al.* , 2003); ORBmor : 家蚕 *Bombyx mori* (Krieger *et al.* , 2003); ORAgam : 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (Pitts *et al.* , 2004); ORDro : 果蝇 *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.* , 2000).

载体上进行表达,为进一步研究该嗅觉受体的功能奠定了基础。

2.2 基因表达谱

用半定量 RT-PCR 对棉铃虫 *ORHarm* 基因的表达谱进行了研究。结果显示, *ORHarm* 主要在棉铃虫触角中表达,在喙中也有表达,但表达量较低,在

其他的部位不表达(图 3 : A),在卵、幼虫、蛹和成虫体内也都有表达(图 3 : C)。昆虫的触角主要感受空气中挥发性气味物质,而喙则是通过直接的接触来探测寄主是否适合于生存和产卵,因此, *ORHarm* 不仅在感受挥发性气味物质的过程中起着重要的作用,而且也参与液态的化学刺激的识别过程。

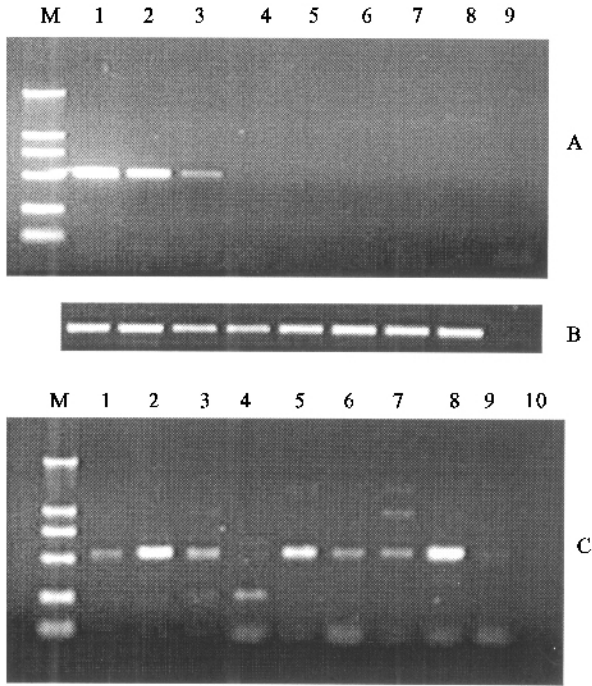


图3 *ORHarm* 基因在棉铃虫不同组织和不同发育时期的表达

Fig. 3 Tissue specificity of *ORHarm* expression
A : M. 标准分子量 Standard molecular weight (DL2000) ; 1 ~ 8 . 分别为雌蛾触角、雄蛾触角、喙、头、胸、腹、足和翅 1 - 8 represent antennae of female moth , antennae of male moth , proboscises , head , thorax , abdomen , legs , and wings , respectively ; 9 . 不加模板的负对照 Negative control without template . B : 内标基因 18S RNA Inner mark gene 18S RNA . C : M. 标准分子量 Standard molecular weight (DL2000) ; 1 ~ 9 . 分别为卵、1 龄幼虫、5 龄幼虫、化蛹第 1 天、化蛹第 4 天、化蛹第 7 天、化蛹第 10 天、成虫和成虫后期 1 - 9 represent egg , 1st instar , 5th instar , the 1st day of pupation , the 4th day of pupation , the 7th day of pupation , the 10th day of pupation , adult , late adult , respectively ; 10 . 不加模板的负对照 Negative control without template .

3 讨论

近年来 ,国际上多个实验室以果蝇为材料 ,对果蝇嗅觉受体功能的研究取得了突破性进展。在果蝇基因组全序列测定的基础上 ,科学家们利用一种新的计算机算法 ,即根据受体蛋白的特征搜寻所有的 G 蛋白偶联的受体家族 ,推断在果蝇嗅觉器官中可能存在 60 多种气味受体 ,大部分的果蝇嗅觉神经表达两类气味受体基因 :一类是高度变异的传统的气味受体 (conventional odorant receptor) ,另一类是在不

同昆虫间高度保守的非典型的气味受体 (atypical odorant receptor) Or83b。本研究从棉铃虫触角中克隆 *ORHarm* 属于后者。Larsson 等 (2004) 敲除了一个果蝇品系中的 *Or83b* 基因 ,结果这类果蝇的幼虫和成虫对气味都不敏感 ,转基因营救 (transgenic rescue) 实验表明来自蚊子和烟芽夜蛾的 *Or83b-like* 基因也具有 *Or83b* 的功能 (Jones *et al.* , 2005) 。 *Or83b* 类似基因不是单独对气味分子起识别作用 ,而是与传统的高度变异的受体协同对气味分子起作用 (Larsson *et al.* , 2004) 。在瓜蟾 *Xenopus* 的卵母细胞中对家蚕气味受体的研究也证实了这一点 , *BmOR2* 基因 (*Or83b* 类似基因) 能增强 *BmOR1* 基因的表达和功能 (Nakagawa *et al.* , 2005) 。

对传统气味受体功能的研究最近也取得了突破性进展。耶鲁大学 John Carlson 的实验室敲除了一个果蝇品系 ab3A 神经中的 DORs 22a 和 22b 受体 ,突变的果蝇变得对气味不敏感 ,随后他们又通过转基因的方法将 DORs 22a 和 22b 两个受体分别引入到 ab3A 神经中进行表达 ,结果表明 DORs 22a 对气味敏感 ,而 DORs 22b 在 ab3A 中没有功能 (Dobritsa *et al.* , 2003) 。利用这一系统 ,Hallem 等 (2004b) 鉴定了果蝇完整的嗅觉反应谱 ,所有的 24 个有功能的嗅觉受体的反应谱都是不同的。这些研究第一次阐明了为什么果蝇能用如此少的嗅觉受体 (与哺乳动物相比较) 鉴别出成千上万种气味分子。这一系统也可用于研究其他昆虫嗅觉受体的功能 ,如最近成功鉴定了 2 个冈比亚按蚊的嗅觉受体的功能 (Hallem *et al.* , 2004a) 。

目前对于气味受体的研究主要是着重于基础理论的研究 ,从应用角度出发 ,我们可以将这些新的技术和方法用于农业害虫的研究 ,通过阐明并试图切断害虫嗅觉识别途径从而达到控制害虫的目的。

参考文献 (References)

Adams MD , Celniker SE , Holt RA *et al.* , 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster* . *Science* , 287 (5 461) : 2 185 - 2 195 .
Ben-Arie N , Lancet D , Taylor C , Khen M , Walker N , Ledbetter DH , Carrozzo R , Patel K , Sheer D , Lehrach H , North MA , 1994. Olfactory receptor gene cluster on human chromosome 17 : Possible duplication of an ancestral receptor repertoire . *Hum . Mol . Genet .* , 3 : 229 - 235 .
Buck LB , Axel R , 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors : A molecular basis for odor recognition . *Cell* , 65 : 175 - 187 .
Clyne PJ , Warr GG , Freeman MR , Lessing D , Kim J , Carison JR , 1999. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins : Candidate odorant receptors in *Drosophila* . *Neuron* , 22 : 327 - 338 .
Dobritsa AA , van Naters , Warr CG , Steinbrecht RA , Carlson J , 2003.

Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* , 37 : 827 – 841 .

Hallem EA , Fox AN , Zwiebel LJ , Carlson JR , 2004a. Mosquito receptor for human-sweat odorant. *Nature* , 427 : 212 – 213 .

Hallem EA , Ho MG , Carlson JR , 2004b. The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Cell* , 117 (7) : 965 – 979 .

Hill CH , Fox AN , Pitts RJ , Hunt LH , Collins FC , Robertson HM , Zwiebel LJ , 2002. G-protein coupled receptors in the malaria *Anopheles gambiae*. *Science* , 298 : 176 – 178 .

Jones WD , Nguyen TT , Kloss B , Lee KJ , Vosshall LB , 2005. Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution. *Current Biology* , 15 (4) : 119 – 121 .

Krieger J , Grosse-Wilde E , Gohl T , Dewer YME , Raming K , Breer H , 2004. Gene encoding candidate pheromone receptors in a moth (*Heliothis virescens*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 101 (32) : 11 845 – 11 850 .

Krieger J , Klink O , Mohl C , Raming K , Breer H , 2003. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J. Comp. Physiol. A* , 189 (7) : 519 – 526 .

Krieger J , Raming K , Dewer YME , Bette S , Conzelmann S , Breer H , 2002. A divergent gene family encoding candidate olfactory receptors of the moth *Heliothis virescens*. *European Journal of Neuroscience* , 16 : 619 – 628 .

Larsson MC , Domingos AI , Jones WD , Chiappe ME , Amrein H , Vosshall LB , 2004. *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* , 43 : 703 – 714 .

Li F , Prestwich GD , 1997. Expression and characterization of a lepidopteran general odorant binding protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 27 (5) : 405 – 412 .

Nakagawa T , Sakurai T , Nishioka T , Touhara K , 2005. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science* , 307 : 1 638 – 1 642 .

Ngai J , Dowling MM , Buck LB , Axel R , Chess A , 1993. The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell* , 72 : 657 – 666 .

Pitts RJ , Fox AN , Zwiebel LJ , 2004. A highly conserved candidate chemosensory receptor expressed in both olfactory and gustatory tissues in the malaria vector mosquito , *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 101 : 5 058 – 5 063 .

Raming K , Krieger J , Strotmann J , Strotmann J , Boekhoff I , Kubick S , Baumstark C , Breer H , 1993. Cloning and expression of odorant receptors. *Nature* , 361 : 353 .

Rogers ME , Jani MK , Vogt RG , 1999. An olfactory-specific glutathione-S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* , 202 : 1 625 – 1 637 .

Sambrook KJ , Fritsch EF , Maniatis T , 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory.

Vogt RG , Riddiford LM , 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* , 293 : 161 – 163 .

Vosshall LB , Amrein H , Morozov PS , Rzhetsky A , Axel R , 1999. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell* , 96 : 725 – 736 .

Wang GR , Guo YY , Wu KM , 2002a. Progress in the studies of antenna odorant binding proteins of insects. *Acta Entomologica Sinica* , 45 (1) : 131 – 137 . [王桂荣 , 郭予元 , 吴孔明 , 2002a. 昆虫触角气味结合蛋白研究进展. 昆虫学报 , 45 (1) : 131 – 137]

Wang GR , Guo YY , Wu KM , 2002b. Expression and identification of general odorant binding protein II from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Acta Entomologica Sinica* , 45 (3) : 285 – 289 . [王桂荣 , 郭予元 , 吴孔明 , 2002b. 棉铃虫普通气味结合蛋白 II 基因的表达及鉴定. 昆虫学报 , 45 (3) : 285 – 289]

Wang GR , Guo YY , Wu KM , 2004a. Molecular cloning , bacterial expression of pheromone binding protein in the antenna of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* , 57 (1) : 15 – 27 .

Wang GR , Guo YY , Wu KM , 2004b. Cloning of cDNA fragment of an antennal-specific gene in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* , 1 (1) : 1 – 7 .

Wang GR , Wu KM , Guo YY , 2003. Cloning , expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* , 33 : 115 – 124 .

Wang GR , Wu KM , Liang GM , Guo YY , 2005. Gene cloning , expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its Cry1A binding region. *Science in China Ser. C. Life Sciences* , 48 (4) : 346 – 356 . [王桂荣 , 吴孔明 , 梁革梅 , 郭予元 , 2004. 棉铃虫中肠钙粘蛋白基因的克隆、表达及 Cry1A 结合区定位. 中国科学 , 34 (6) : 537 – 546]

Zwiebel LJ , Takken W , 2004. Olfactory regulation of mosquito-host interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* , 34 (7) : 645 – 652 .

(责任编辑 : 黄玲巧)